

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学 号: 200326135

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

东太平洋金属结核区微生物多样性分析

**Analyses of microbiology diversity in the east**

**Pacific nodule province**

张海艳

指导教师姓名: 肖 湘 教 授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2006 年 8 月

论文答辩时间: 2006 年 9 月

学位授予日期: 2006 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2006 年 8 月

# 厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。  
本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在          年解密后适用本授权书。

2、不保密（  ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期：      年    月    日

导师签名：

日期：      年    月    日

厦门大学博硕士论文摘要库

# 目录

摘要.....	i
Abstract.....	iii
1 前言.....	1
1.1 深海研究概况.....	1
1.2 深海生态特点.....	2
1.3 深海微生物多样性.....	4
1.3.1 种类多样性.....	4
1.3.2 遗传多样性.....	9
1.3.3 生态系统多样性.....	10
1.3.4 代谢类型多样性.....	10
1.4 海洋微生物在海洋物质循环中的作用.....	13
1.5 深海微生物的开发利用.....	14
1.6 微生物多样性的研究方法.....	17
1.7 本文的研究方法、目的和意义.....	22
2 材料与方法.....	23
2.1 材料与设备 .....	23
2.2 基本方法 .....	28
3 结果与分析.....	34
3.1 可培养微生物的分离和生长特性的初步测定.....	34
3.2 东太平洋金属结核区可培养微生物的鉴定.....	39
3.3 东太平洋金属结核区可培养微生物的多样性.....	42

4 讨论.....	57
-----------	----

5 总结.....	61
-----------	----

参考文献.....	62
-----------	----

附录

致谢

厦门大学博硕士论文摘要库

## Contents

<b>Chinese abstract</b>	<b>i</b>
<b>English abstract</b>	<b>iii</b>
<b>1. Introduction</b>	<b>1</b>
1.1 Summary of deep sea study	1
1.2 Environment characteristic of deep sea	2
1.3 Diversity of deep-sea microorganism	4
1.3.1 Species diversity	4
1.3.2 Descendiblity diversity	9
1.3.3 Ecosystem diversity	10
1.3.4 Metablization diversity	10
1.4 Role of deep-sea microbiology in matter cycle	13
1.5 Exploitation and utilization of deep-sea microbiology	14
1.6 Study method for microbiology diversity	17
1.7 Purpose ,route and signification of my thesis	22
<b>2. Materials and methods</b>	<b>23</b>
2.1 Meterials and equipment	23
2.2 Methods	28
<b>3 Results and analysis</b>	<b>34</b>
3.1 Isolation and measurement of cultured microbiology in east Pacific nodule province	34
3.2 Classification of isolates from east Pacific nodule province	39
3.3 Diversity analysis of isolates	42

<b>4 Discussion</b> .....	57
---------------------------	----

<b>5 Summary</b> .....	61
------------------------	----

<b>Reference</b> .....	62
------------------------	----

**Apeendixes**

**Acknowledgements**

厦门大学博硕士论文摘要库



## 东太平洋金属结核区微生物多样性分析

### 摘要

在所有已知的深海资源中, 目前受到普遍关注和研究程度最高的是多金属结核。多金属结核在大洋底普遍存在, 它是一种富含铁、锰、镍、钴等有用金属元素的洋底自生沉积矿物集合体。中华人民共和国于 1991 年 3 月 5 日经联合国海底管理局批准, 获得了在东太平洋中部 15 万平方公里的开辟区, 至今已进行了十多个航次的调查和研究。对金属结核区的细菌种类组成和特征进行研究, 将更加有助于探讨多金属结核的成因机理, 为开发新的生物资源提供依据。

本研究所用到的样品是 2001 年 5 月到 2003 年 11 月期间, 经由中国大洋协会环境协会生物资源开发项目的“DY105-12、14”航次两个航次, 采自于热带太平洋东部(多金属结核区)水深 5000 至 5246 米的洋区。对这些样品进行了微生物的筛选以及生物多样性分析。

针对采样点的特点, 对沉积物样品进行了热激处理, 选择了普通海洋细菌培养基 2216E、培养锰细菌和铁细菌的培养基、以纤维素和木质素为唯一碳源的选择性培养基进行微生物的分离和培养, 培养的温度为 4—15℃和 55℃。共获得了纯培养菌株 71 株, 通过 16SrRNA 基因序列分析发现,  $\gamma$ -proteobacteria 是可培养细菌的主要类群, 另外还包括  $\alpha$ -proteobacteria、 $\beta$ -proteobacteria、低 G+C 含量的革兰氏阳性菌, 高 G+C 含量的革兰氏阴性菌。所测定的细菌除 AE9 外其他菌株与 NCBI 数据库中的已知菌株的同源性都超过了 93%。

对这些可培养细菌进一步分析发现, 有些细菌与具有金属抗性的细菌相关, 这可能与该地区富含金属的特性有关; 有些菌与芳香族物质降解细菌或分离自芳香族物质污染地区的细菌有关, 表明该地区可能受到了芳香族类有机物污染。

在检测所分离细菌对环境因子(温度、盐度、pH)的适应情况时发现, 链霉菌的耐盐范围为 0-7% (w/v), 属轻度耐盐菌, 而且最高生长温度为 42℃, 其他菌株的温度生长范围均在 4-30℃, 在所分离的菌株中有 11 株菌属于中度嗜盐菌, 它们不仅能在淡水中生长, 可以在较高的盐浓度(盐度 10%及以上)生长,

5 株属于抗碱微生物, 没有筛到耐酸的菌株, 这些情况与海洋中的天然环境低温、含盐、偏碱相一致。

对所分离的菌株进行产酶能力的分析时发现, 能够产脂肪酶的菌株占 31%, 产明胶酶的菌株占 24%, 产淀粉酶的菌株占 35%, 有 4 株菌产  $\beta$ -半乳糖苷酶。

**关键词:** 深海沉积物; 可培养微生物; 微生物多样性

厦门大学博硕士论文摘要库

## **Analyses of microbiology diversity in the east Pacific nodule province**

### **Abstract**

The sediment samples used in this study were collected from the east Pacific nodule province with water depth from 5000m to 5246m by cruises “DY105-12,14” which was organized by China Mineral Resources Association., during the time period from May 2001 to November 2003.

Nodule province was compound including iron, manganese, nickel, Cobalt , and so on. These elements are valuable deep-sea source. China obtained the right to exploit in this area on 5 March, 1991.

Microbiology are believed to play large roles in the metal cycling in many environments. Bacteria in this area possess potential study and applied value. To investigate the microbiology diversity , direct cultivation was used to estimate abundance and diversity of bacteria in samples. The sample analyses were carried out in the lab as following:

(1) Sample treated by hot shock and sample untreated were used. Strain were isolated using 2216E, culturing iron bacteria medium, culturing manganese bacteria medium and other nutrient plates.

(2) After microbial strains were isolated, growth patterns of 71 strains were tested under a set of temperatures, salinities and pH values and enzyme production of the culturable microorganisms.

(3) Microbiology diversity was analyzed based on 16S rRNA gene sequence.

The main results are summarized below:

Most isolates belong to cold-tolerance bacteria and can grow from 4°C to 30°C. Some alkaline-tolerance bacteria and salt-tolerance bacteria were also isolated from the sediment but no acid-tolerance. Some bacteria can degrade gluten, amylum, lipid

and  $\beta$ -galactose.

The molecular classification and identification of these isolates based on the 16S rRNA gene sequences indicated that the  $\gamma$ -proteobacteria subgroup was dominant bacteria groups in the sediment sample from the east Pacific nodule province. In addition to this there were  $\alpha$ -proteobacteria subgroup,  $\beta$ -proteobacteria subgroup,  $G^+$  bacteria of low G+C% and  $G^+$  bacteria of high G+C%.

Bacteria correlative with aromatic compound degrading bacteria or bacteria isolated from aromatic substance contaminated area were found in our sample. It meant that the deep-sea might have been polluted by aromatic organic material.

Bacteria related to heavy metal-tolerance were found in our study. It is link to characteristic of containing heavy metal.

**Key word:** deep sea sediments; culturable microbiology; microbiology diversity

## 1 前言

### 1.1 深海研究概况:

地球表面总面积约  $5.1 \times 10^8 \text{ km}^2$ , 分属于陆地和海洋。如以大地水准面为基准, 陆地面积为  $1.49 \times 10^8 \text{ km}^2$ , 占总面积的 29.2%; 海洋面积为  $3.61 \times 10^8 \text{ km}^2$ , 占总面积的 70.8%。海陆面积之比为 2.5:1, 可见地表大部分为海水覆盖。

大洋是海洋的主题部分, 一般远离大陆, 面积广阔, 约占海洋总面积的 90.3%; 深度大, 一般 2000m; 海洋要素如盐度、温度等不受大陆影响, 盐度平均为 35, 且年变化小; 具有独立的潮汐系统和强大的洋流系统。世界大洋通常被分为四大部分, 即太平洋、大西洋、印度洋和北冰洋。太平洋是面积最大 ( $1.797 \times 10^6 \text{ km}^2$ , 占世界海洋总面积的 49.8%)、最深的大洋 (平均深度 4028m, 最大深度 11034m, 均为各大洋之最), 其北侧以白令海峡于北冰洋相接; 东边以通过南美洲最南端合恩角的经线与大西洋分界; 西以经过塔斯马尼亚岛的经线 ( $146^\circ 51' \text{ E}$ ) 与印度洋分界。

相对于近岸浅海区而言, 大洋区的环境是相对稳定的。大部分大洋表层阳光充足, 浮游植物可在那里进行光合作用。透光层的下方是大洋区最主要的部分, 那里光线微弱或因无光而不能进行光合作用。海底部分从大陆架以外的大陆斜坡至深度达 10000 米的超深渊带, 构成了深海区域, 面积超过地球面积的 50%, 长期以来被认为是一片“荒芜的沙漠”。但 1977 年美国科学家 Bischoff 博士等 3 人乘《Alvin》号在东太平洋海隆 (北纬  $21^\circ$  左右) 进行海底热泉考察时, 在水深 2500-2700m 的海底发现了数十个高约 2-5 米正向海水中喷着黑色烟雾的“黑烟囱”。这些“烟囱”普遍含有大量 Cu、Pb、En、Fe、Co、Ni 外, 还富含 Au、Ag、Pf 等重金属。更令人不可思议的是, 烟囱周围生活着大量奇形怪状的生物, 他们生存的密度很高, 俨然是一个庞大而有序的生物群落。这一生物群落中新发现的生物种类达 10 个门, 500 多个种属, 其中很多是热液口所特有的。有人将这样五彩缤纷、生机勃勃的海底生物世界称为海底“生命绿洲”。

虽然海底采集沉积柱状样已经有近八十年的历史, 但是大规模的系统研究开始于 1968 年的深海钻探计划, 已经经历了 DSDP (1968-1983)、ODP (1985-2003) 两个阶段。作为迄今为止历时时间最长、成效最大的国际地球科学合作计划, ODP 于 2003 年 10 月结束, 取而代之的是一个规模更加宏大、科学目标更具有

挑战性的新的科学大洋钻探计划,它是综合大洋钻探计划 IODP(Integrated Ocean Drilling Program)。大洋钻探计划 (ODP) 以独特的视角为我们呈现出另外一个生命世界—掩埋在洋底沉积物中和地壳中的生物圈。深部生物圈是 ODP 今年来最为重大的发现之一。对 ODP 采集的沉积物样品的地球化学研究揭示,在几乎全世界所有的大洋底以下都发现了细菌活动。对 ODP 样品中的微生物细胞进行直接计数表明,微生物在洋底以下的深海沉积物中是普遍存在的。迄今为止,生物地球化学和微生物学研究已经将海底以下沉积物生物圈的最大估计埋深延伸至洋底 800m 以下。启动 2002 年的 ODP201 航次是第一个专门致力于研究洋底以下的生命的大洋钻探航次。它的主要目标是记录洋底以下生物的生活习性、分布范围和细菌活动所造成的生物化学影响,以及在不同埋深环境下的原核生物群落。其研究表明,从生物地球化学的角度,地表以下的微生物可能组成了地球生命的一大重要部分。从样品的直接细胞计数推断,洋底沉积物中的成岩作用和大洋玄武岩的风化作用,影响到长期的全球生物地球化学循环。在一定条件下,洋底以下微生物有时可能还在较短时间尺度上影响地表。从海洋沉积物的水合物中断续释放出来的甲烷可能在地球历史上多次严重影响全球的气候和海洋。

## 1.2 深海生态特点

深海一般指是位于海洋 1000m 以下的深度区域,占地球表面积的一半。海洋的平均深度为 3800m,最深的海沟为 11000m,而 6000m 以下的深海只占海洋总体积的 0.1%,地球绝大部分深海都为 1000-6000m 深。与陆地相比,深海具有以下特征:

### 高压

水深每增加 10 m,其静压力约增加 1 个大气压,所以深海海底要承受 400 个以上大气压的静压力,而马里亚纳海沟水深为 10924 m,静压力超过了 1000 个大气压,可谓超高压。在巨大的静压力下,深海的洋床,即使是沉积物也坚实的近乎岩石一般。因此生长在 5000 m 深度的生物,必须能耐受 500 个大气压的压力<sup>[1]</sup>。

### 黑暗

在 3800m 以下的深海,完全没有太阳光。因为光线早在距洋面几十米深的水体中就被迅速吸收掉了,这里仅有的光线是少量的生物发光和同位素产生的射

线。因此在深海没有进行光合作用的生物存在，生物的生存可能与具有共生关系的细菌有关<sup>[2]</sup>。

### 低温

除了海底火山口及其附近的地方，深海世界除少数部分地方外（如苏路海的海底温度为 9.8℃，地中海的海底温度为 13.5℃）深海的温度处 1—4℃，有人称之为世界上最大的冷藏箱。在这里生存的生物必须能耐受低温。但也有一些地方有热泉喷出口，不断喷出的热液，使周围形成中心水温高达 300-400℃的高温环境。在这个环境里，生长着世界上最嗜热的微生物<sup>[3]</sup>，这里有着特殊的生存环境和生物群落组成<sup>[4]</sup>。

### 高盐

可溶物总量称为盐度，溶解的物质包括无机盐和来自活体的有机物以及溶解的气体，其中大部分是以离子的形式存在，深海的盐度处于稳定状态，盐度为 30 左右，因此生活在深海的微生物能够耐受 30 以下的盐度。

### 有机含量低

由于光线只能到达水深 300 m，因此光合作用也只能在 300 m 以上的海水中进行。前人研究表明，在深度 300-1200 m 的海域内，4%的有机物被分解掉，只有 1%的光合作用产物可达 1200 m 以下的深海和海底，因此深海有机物含量极低。

### 高度的净化能力

陆地世界和海洋本身的生命活动，长年累月排放的巨大数量的垃圾、各种污染物，最终都排向并累积在深海海底。但 Hamamoto 等<sup>[5]</sup>研究发现，深海依然清静，显示了其具有高度的净化能力；同时在深海环境中已经分离并培养了对有机物等有毒物质具有分解能力的菌株<sup>[1]</sup>。

### 低溶解氧

所有的深海水都起源于北极区和南极区，富含氧的冷水逐渐下沉，并向北或南流去，形成世界大洋的深水。深海水团下沉之后不再有氧补充进去，而深水动物之所以未将水团中的氧耗去，可能是他们的数量太少，还不至于全部用完。所以深海水层存在着极少量的氧（除少数例外，如加勒比海的卡利亚科海沟和圣巴巴拉海盆）。

### 1.3 深海微生物多样性

微生物总是出现在它们能够生存的一切物理、化学、地质环境中，这似乎是一条基本规律<sup>[6]</sup>。那些在极端环境中生长并通常需要这种极端环境正常生长的微生物被统称为极端微生物。极端环境涵盖了物理极端环境（如温度、辐射、压力、磁场、空间、时间等）、化学极端（如干燥、盐度、酸碱度、重金属浓度、氧化还原电位等）和生物极端（如营养、种群密度、生物链因素等），海底被认为是上述极端环境中的极端。近年来，海洋微生物的研究日益被重视，对海洋微生物的生态调查、生理和遗传特征以及开发利用都有许多研究<sup>[8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16]</sup>。

在一项最新的深海沉积物原核生物的研究中，Schippers 等<sup>[7]</sup>利用 CARD-FISH (catalysed reporter deposition-fluorescence in situ hybridization) 等技术发现，在深海沉积物表面 400 m 以下仍然有大量的原核生物存活，这些生物均属于细菌，有着 1600 万年的历史。大洋钻探项目研究还发现，大洋沉积物大约生活有地球一半的原核生物细胞。因此深海微生物被称为生物圈的延续：生物圈不仅局限于地球表面，还延续到几千米深的海底。总之，深海是一个特殊的生态环境，这里永久低温(火山口除外)、高压、黑暗。对深海微生物的研究不仅有助于了解生命的起源，而且可以了解各种极端微生物的生活特性，有助于对深海微生物资源的开发利用。

生物多样性可以理解为生物物种的多样化及其变异的程度和广度，是物种多样性、遗传多样性和生态系统多样性3个层次上的综合表述<sup>[17]</sup>。海洋微生物多样性是所有海洋微生物种类、种内遗传变异及其生存环境的总称，包括生活环境的多样性、生长繁殖速度的多样性、营养和代谢类型的多样性、生活方式的多样性、基因的多样性和微生物资源开发利用的多样性等<sup>[18, 19]</sup>。海洋微生物多样性由于自身的特点和当前研究的手段，决定了目前海洋微生物多样性的研究通常集中于以下几个水平，即分类多样性、功能多样性、遗传多样性和系统发育多样性<sup>[17]</sup>。

#### 1.3.1 种类多样性

海洋微生物，一般指分离自海洋环境，其正常生长需要海水，并可在寡营



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库